

اثر ضد تکثیری نانو نقره سنتز شده با استفاده از گیاه آب بشقابی بر رده سلولی سرطان پستان

شیماء عدالت فرد^۱، فرزانه تفویضی^{۱*}، مریم بی خوف تربتی^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران، ^۲گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۶

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از گیاهان جهت سنتز نانوذرات یکی از روش‌های دوست‌دار محیط زیست به شمار می‌رود. هدف از این تحقیق، سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از عصاره *Centella asiatica* و بررسی اثرات سایتوکسیک در رده سلولی سرطان پستان بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ریخت‌شناسی نانوذرات نقره زیستی با استفاده از آنالیز میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفت. از آزمون MTT جهت بررسی اثرات ضد تکثیری نانوذرات زیستی در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و سلول نرمال (HEK-293) استفاده شد. آزمون آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری با کیت Annexin V انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنوا دو طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نرات کروی با میانگین ۱۹ نانومتر سنتز شدند. فعالیت ضدتکثیری در سلول‌های MCF-7 با افزایش غلظت و زمان نانوذره افزایش یافت. IC50 نانوذره نقره در زمان ۲۴ ساعت ۸/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های سرطانی بود. افزایش آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با نانوذره زیستی در غلظت IC50 نسبت به سلول‌های کنترل دیده شد ($p < 0.001$). همچنین القا آپوپتوز بیشتری در برابر نکروز در سلول‌های MCF-7 نسبت به کنترل دیده شد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: نانوذرات نقره سنتز شده دارای اثر سمیت سلولی و القا آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطانی در الگوی وابسته به غلظت و زمان می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: گیاه آب بشقابی، نانو ذرات نقره زیستی، سمیت سلولی

*نویسنده مسئول: فرزانه تفویضی، گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

Email: farzanehtafvizi54@gmail.com

مقدمه

سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در میان زنان است و از هر ۸ تا ۱۰ زن، یک نفر دچار سرطان پستان می‌شود. بر اساس آمارهای موجود در ایران از هر ۱۰ تا ۱۵ زن، احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد، اما سن بروز سرطان پستان در زنان ایرانی دست کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است. سرطان پستان، دومین علت رایج مرگ ناشی از سرطان است (۱). سرطان پستان در اثر تأثیر متقابل عوامل خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیشرونده تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک در سلول‌های سرطان پستان منجر می‌شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عوامل خطر ویژه مانند؛ سن، چاقی، مصرف الکل، برخورد با استروژن در طول زندگی تأکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان پستان، قویترین عامل خطر برای این بیماری به شمار می‌آید (۲).

امروزه جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی را به عنوان راه مناسب درمان سرطان پستان می‌شناسند، اما همه آن‌ها در حد متفاوتی منجر به هیپوکسی می‌شوند. جراحی کمتر ولی شیمی‌درمانی، وظیفه‌ای جز هیپوکسیک کردن و احتمالاً مرگ سلولی ندارد. داروهای ضد رگ‌زایی سبب هیپوکسی نسج می‌شود. هر توده سرطان در پستان تنها ۷۰ درصد از سلول‌های پستان را در خود جای داده است و ۳۰

درصد بقیه را سلول‌های بنیادی تشکیل می‌دهد و پاسخ این سلول‌ها در مقابل درمان‌های رایج با سلول‌های نسج پستان متفاوت است. درمان‌های رایج که منجر به هیپوکسی می‌شود، زمینه تولید و افزایش فاکتورهایی را باعث می‌شود که امروزه آن را Hypoxia inducible - factor می‌شناسیم. این عوامل منجر به ترکیب سلول‌های بنیادی شده و با بازسازی این سلول‌ها و فعال شدن مجدد آن‌ها متاستاز اتفاق می‌افتد (۳).

از مهم‌ترین اثرات سمی نانو ذرات، اثرات آن بر سلول سرطانی است. بزرگترین چالش در توسعه و استفاده از داروهای سرطانی، رساندن آن‌ها به بافت‌های بیمار بدون مسموم نمودن کل بدن است. اندازه نانو ذرات به آنها خواص ویژه‌ای برای ورود و خروج از تومورها را اهدا می‌کند (۴).

نانو ذرات کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر مشابه داروهای موسوم به ریز مولکول، سریعاً از طریق کلیه دفع می‌شوند، حال آن‌که ذرات بزرگ‌تر از ۱۰۰ نانومتر به سختی می‌توانند از تومور عبور کنند. ذرات بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر درون جریان خون تا یافتن تومورها حرکت می‌کنند، ولی نمی‌توانند از دیواره مویرگ‌ها به سلول سالم راه یابند. دلیل این تفاوت آن است که دیواره مویرگی تومورها غیر عادی و حاوی سوراخ‌های بزرگی است که نانو ذرات می‌توانند از آنها به تومورها وارد شوند. در نتیجه نانو ذرات متمایل به تجمع درون تومورها با حداقل اثرات سوء بر سایر اعضای بدن هستند که این مساله به معنای

کاهش اثرات جانبی نامطلوب متداول داروهای سرطانی است (۵). حتی وقتی یک داروی متعارف به سلول تومور وارد می‌شود، ممکن است پیش از انجام هر کاری پروتئین‌های پمپ‌کننده سلول آن را از سلول بیرون بیاندازند که یک سازو کار مرسوم مقاومت به دارو است، اما نانو ذرات از طریق آندوسایتوزیس وارد سلول می‌شوند و لذا محموله نانو ذره از دسترس پمپ سلولی در امان است (۶).

روش‌های متداول تولید نانو ذرات شامل: روش‌های فیزیکی، شیمیایی و روش زیستی می‌باشند. مزایای روش زیستی مانند هزینه کمتر، سرعت بیشتر، مقیاس بالای تولید و عدم آسیب به محیط زیست باعث شده که توجه بیشتری به تولید نانو ذرات با این روش نسبت به دو روش دیگر شود. امروزه داروهای گیاهی به علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷).

سالانه بر روی کره زمین در حدود چهارصد میلیارد تن، کربوهیدرات از گیاهان تولید می‌شود که بسیاری از این کربوهیدرات‌ها، پلی ساکارید هستند (۸). پلی ساکاریدها دارای عوامل بسیاری از جمله گروه‌های هیدروکسیل و دسته ترکیب‌های آلی بوده که قادر به احیای محلول‌هایی حاوی نمک فلزات می‌باشند (۹).

عصاره برگ گیاهان که غنی از پلی فنیل‌هایی مانند فلانوئیدها هستند، عوامل قدرتمند احیاء کننده در سنتز نانو ذرات طلا و نقره خواهند بود. بنابراین در

بسیاری از مقالات به استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانو ذرات اشاره شده است (۱۰).

گیاه آب بشقابی با نام علمی *Centella asiatica* از خانواده چتریان می‌باشد. در گذشته‌های دور این گیاه را اکسیر معجزه‌آسای حیات می‌نامیدند. در سال ۱۹۹۸ در کانادا این گیاه به عنوان برجسته‌ترین دارو شناخته شد و در طول تاریخ از آن برای درمان بیماری‌هایی مانند: سیفلیس، هیپاتیت، زخم‌های معده، مشکلات مغزی، صرع، اسهال و تب و آسم استفاده می‌نمودند. این گیاه علفی، پایا، رونده، نیمه‌آبزی است و بومی نواحی گرمسیری در هر دو نیمکره به خصوص سری لانکا و جنوب آفریقا، جنوب شرقی آسیا، هند و قسمت‌هایی از چین و جنوب غربی دریای ایسلند، ماداگاسکار، جنوب و جنوب شرقی آمریکا، مکزیک، ونزوئلا و کلمبیا می‌باشد. با توجه به منابع معتبر، مشاهدات محققین و نمونه‌های دقیق هرباریومی تا کنون پراکنشی فراتر از محدوده تالاب انزلی در ایران برای آن گزارش نشده است (۱۱). ترکیب‌های اصلی این گیاه، اسیدآسیاتیک و اسیدمادکاسسیک و سایر مشتقات گلیکوزیدهای استری‌تری‌ترپنی، آسیاکوزید و مادکاسوزید می‌باشند (۱۲). در بیشتر مطالعه‌های جدید نشان داده شد که این گیاه در از بین بردن سلول‌های تومور سرطانی در محیط کشت مؤثر است، در این مطالعه‌های مشخص شده که عصاره گیاهی ۵:۱ تغلیظ شده با متانول به مقدار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی سلول‌های سرطانی مؤثر است (۱۳).

شستشوی انتهایی با اتانول انجام شد و محصول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴ ساعت قرار داده شد.

پس از سنتز نانو ذرات به روش زیستی، اندازه ساختار و ریخت شناسی نانو ذرات تولید شده به وسیله تکنیک‌های مختلفی از جمله میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)^(۱) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^(۲) انجام گرفت. عکس‌برداری SEM به وسیله دستگاه Zeiss Sigma (آلمان) و عکس‌برداری TEM از نانوذرات نقره به وسیله دستگاه Zeiss EM10C-100 KV (آلمان) به وسیله شرکت دی پترونیک انجام شد.

در این مطالعه رده سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) و سلول نرمال HEK-293 از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)^(۳)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند. جهت بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، به وسیله تریپسین ۰/۰۵ درصد از ته فلاسک جدا شدند و در

استفاده از گیاهان جهت سنتز نانوذرات به دلیل عدم استفاده از مواد آلاینده و سمی یکی از روش‌های دوست‌دار محیط زیست به شمار می‌رود. گیاهان از جمله سامانه‌های زنده اقتصادی و مؤثر جهت تولید نانوذرات نقره می‌باشند. هدف از این مطالعه، سنتز نانوذره زیستی با استفاده از عصاره برگ گیاه *C. asiatica* و بررسی اثرات ضد تکثیری و القا آپوپتوز نانوذره زیستی سنتز شده بر رده سلولی MCF-7 و مقایسه آن با رده سلولی نرمال HEK-293 بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، به منظور سنتز نانوذرات نقره زیستی با خلوص بالا از روش رسوب گذاری با احیای یون‌های نقره (AgNO₃) (مرک آلمان) به وسیله عصاره گیاه *C. asiatica* استفاده شد. برای استخراج عصاره گیاهی، ۲۰ گرم از پودر گیاه به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول رسانیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و در دستگاه شیکر قرار گرفت. عصاره حاصل به وسیله کاغذ صافی فیلتر شد. نانوذرات نقره با افزودن ۳ میلی‌لیتر از حجم عصاره با غلظت ۰/۰۰۱ میلی مولار AgNO₃ سنتز شدند.

عصاره گیاهی به دلیل ترکیب‌هایی که دارد منجر به احیای نمک نیترات نقره به نانو ذرات نقره می‌شوند. پس از گذشت یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. جهت شستشو در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت

1-Transmissionelectron Microscopy(TEM)
2-Scanning Electron Microscopy(SEM)
3- Fetal Bovine Serum(FBS)

دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریپان بلو به وسیله میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زیستایی بالای ۹۰ درصد جهت انجام آزمایش استفاده شد.

به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره زیستی بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نرمال از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. آزمایش MTT، یکی از روش‌های رنگ سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. این مساله با سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم (MTT) به وسیله آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان با رنگ بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد. در نتیجه فرآیند احیاء، بلورهای بنفش رنگ فورمازون تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به وسیله روش‌های اسپکتروفوتومتری مقدار سنجی می‌شوند. مقدار بلور فورمازون ایجاد شده می‌تواند نشان دهنده درصد سلول‌های زنده باشد.

برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول MCF-7 و HEK-293 در هر خانه پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. انکوباسیون با غلظت‌های مختلف ۰٫۳، ۰٫۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات زیستی طی زمان ۲۴ ساعت و با سه بار تکرار انجام شد. پس از طی زمان مذکور به هر خانه پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر

رنگ MTT (۰٫۳، ۰٫۵ - دیمتیل تیازولیل -۲) -۲، ۰-۵ دیفنیل تترازولیوم بروماید) سیگما، آلمان با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محیط رویی پلیت خارج شد و به چاهک‌ها ایزوپروپانول اضافه شد تا کریستال‌های بنفش رنگ فورمازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده‌اند، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. نتایج حاصله به صورت میزان درصد زیستایی و IC50 (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود) گزارش شدند. جهت گرفتن نتیجه بهتر، آزمایش‌های این تحقیق سه بار تکرار انجام گرفت و میزان بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست}) = \text{میزان بقای سلولی}$

به منظور بررسی القا آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانو نقره زیستی و مقایسه آن با گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دو رنگ Annexin-FITC و پروپیدیوم یدید (PI)، طبق دستور العمل کیت و پروپیدیوم یدید (PI) انجام شد. Annexin V-FITC (Affymetrix, eBioscience, USA) انجام گرفت. برای انجام تست، سلول‌ها برطبق روش گفته شده در آزمون سنجش زیستایی کشت شدند. پس از مشخص شدن غلظت IC50 تیمار مربوطه، سلول‌های

سنجش توان زیستی سلول‌ها بر اساس روش رنگ سنجی در جدول ۱ ارایه شده است.

تیمار سلول نرمال HEK-293 با نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که نانو ذره نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت که از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0/001$). در حالی‌که غلظت ۳ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P = 0/09$) (جدول ۲).

مقدار IC50 نانوذره نقره در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی MCF-7، مقدار ۸/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید که در مقایسه با گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند معنی‌دار بود. هم چنین IC50 مربوط به نانو ذره نقره در زمان ۲۴ ساعت برای سلول‌های نرمال مقدار ۱۸/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتایج حاصل از بررسی القا آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانو نقره زیستی سنتز شده، بیانگر زنده ماندن ۹۲/۱۰ درصدی سلول‌ها می‌باشد که اکثریت آن‌ها تحت آپوپتوز قرار نگرفتند، زیرا با دارو تیمار نشدند. تعداد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه و تأخیری شدند به ترتیب ۲/۴۰ و ۰/۱۱ درصد و اندکی از سلول‌ها که تحت تأثیر مراحل جمع‌آوری و آماده‌سازی، دچار نکروز شدند ۵/۳۹ درصد بود که این تعداد در مقابل سلول‌های سالم و زنده مقادیر ناچیزی محسوب می‌شود (شکل ۳ الف).

MCF-7 با غلظت ۵ و ۸/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو نقره زیستی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با بافر فسفات سالین شسته شدند. به رسوب حاصل از سانتریفوژ سلول‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ Annexin V اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌ها با محلول بایندینگ شستشو داده شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت آنالیز به وسیله دستگاه فلوسایتمتری انجام گرفت.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس دو طرفه، توکی و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

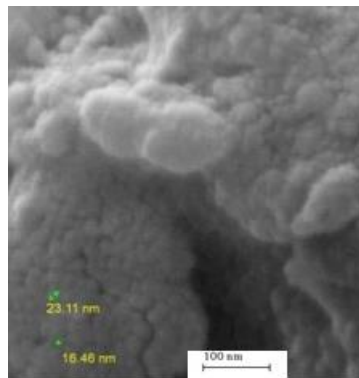
یافته‌ها

با توجه به تصویر SEM، نانوذرات سنتز شده دارای اندازه در محدوده بین ۲۰ نانومتر تا ۶۰ نانومتر داشتند. عکس‌های SEM و TEM در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. قطر میانگین نانو ذرات سنتز شده، ۱۹ نانومتر محاسبه شد.

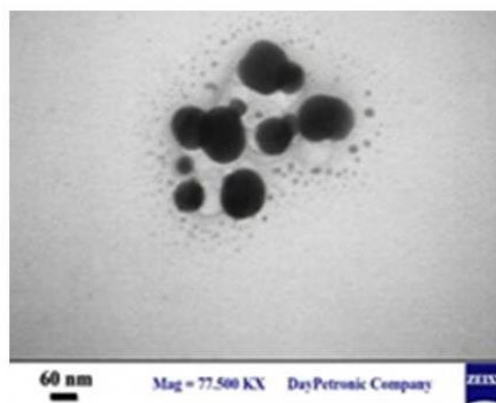
نتایج نشان داد که نانوذره نقره در غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در حالی‌که غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین میزان کشندگی را نشان داد. نتایج

نتایج القا آپتوز در سلول‌هایی که با دوز IC50 ۸/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند در شکل ۳ (ب) ارایه شده است. نتایج مربوط به محاسبه درصد سلول‌های آپتوزی، نکروزی به وسیله فلوسایتومتری حداقل با دو بار تکرار آزمایش به شکل درصد میانگین سلول‌ها \pm انحراف معیار در جدول ۳ و شکل ۳ نمایش داده شده است.

مقایسه آپتوز و نکروز القا شده بر اساس داده‌های فلوسایتومتری در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 و سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل، نشان داد که میزان آپتوز اولیه با مقدار $25/23 \pm 0/5$ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ($p < 0/001$). میزان آپتوز تاخیری نیز با مقدار $10/22 \pm 0/4$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0/001$).



شکل ۱: تصویر SEM از نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله عصاره گیاه *C. asiatica*.



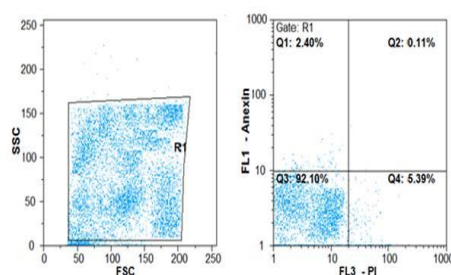
شکل ۲: تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله عصاره گیاه *C. asiatica*.

جدول ۱: میانگین توان زیستی سلول‌های رده MCF-7 با نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش رنگ سنجی. مقادیر به دست آمده براساس میانگین \pm انحراف از معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است

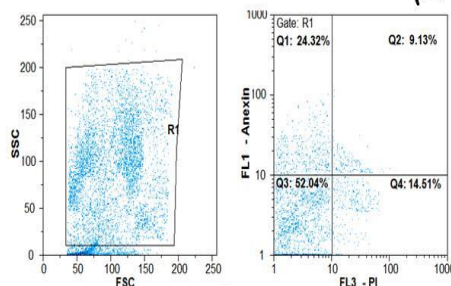
زمان	۳ میکروگرم بر لیتر میلی	۵ میکروگرم بر لیتر میلی	۱۲/۵ میکروگرم لیتر بر میلی	۲۵ میکروگرم بر لیتر میلی	۵۰ میکروگرم بر لیتر میلی	۱۰۰ میکروگرم بر لیتر میلی
۲۴ ساعت	۸۱/۵ \pm ۰/۰۷	۶۴/۵۱ \pm ۰/۱۸	۴۱/۱۱ \pm ۰/۲۱	۲۵/۰۴ \pm ۰/۱۳	۱۰/۷۵ \pm ۰/۱۵	۷/۰۸ \pm ۰/۱
سطح معنی‌داری	۰/۰۶۳	۰/۰۳۸	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۴

جدول ۲: میانگین توان زیستی سلول رده HEK-293 با نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش رنگ سنجی. مقادیر به دست آمده براساس میانگین \pm انحراف از معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است

زمان	۳ میکروگرم بر میلی لیتر	۵ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر	۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر	۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر
۲۴ ساعت	۹۲/۵ \pm ۰/۰۷	۸۲/۵ \pm ۰/۱۸	۶۲/۲۵ \pm ۰/۲۱	۳۹/۷۵ \pm ۰/۱۳	۲۵/۲۵ \pm ۰/۱۵	۱۵/۷ \pm ۰/۱
سطح معنی‌داری	۰/۰۰۹	۰/۰۷۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۵



(الف)



(ب)

شکل ۳: نتایج حاصل از القا آپوپتوز با کیت Annexin V-FITC به وسیله فلوسایتومتری (تست‌ها با دو تکرار انجام شده‌اند و در شکل فقط یک تکرار نمایش داده شده است)، الف) نتایج آپوپتوز در سلول‌های کنترل؛ ب) نتایج آپوپتوز در سلول‌هایی که با دوز IC50 (۸/۷۶ سطح معنی‌داری) نانوذرات نقره زیستی تیمار شدند.

جدول ۳: آپوپتوز القا شده به وسیله نانو ذره نقره سنتز شده به وسیله عصاره گیاه *C. asiatica*

مرگ سلولی	گروه کنترل	IC50 گروه تیمار شده با غلظت نانو نقره زیستی	داری سطح معنی نسبت به گروه کنترل
آپوپتوز اولیه	۳/۳۱ \pm ۰/۷	۲۵/۲۳ \pm ۰/۵	< ۰/۰۰۱
آپوپتوز تاخیری	۰/۸۸ \pm ۰/۸	۱۰/۲۲ \pm ۰/۴	< ۰/۰۰۱
نکروز	۴/۶۷ \pm ۰/۹	۱۳/۷۳ \pm ۰/۶	< ۰/۰۰۵

بحث

فناوری نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که سبب بروز خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی غیر معمول می‌شود و کاربردهای جدید و منحصر به فردی را ممکن می‌سازد (۱۴).

برای تولید نانوذرات روش‌های متفاوتی مانند واکنش‌های شیمیایی، تجزیه حرارتی ترکیب‌ها با کمک گرفتن از پرتوها، روش‌های الکتروشیمیایی، سونوشیمیایی، پردازش با امواج میکرو و غیره وجود دارد، اما متأسفانه در اکثر روش‌هایی که منجر به تولید نانو ذرات می‌شود، استفاده از مواد خطرناک یک اجبار است (۱۵).

از این رو نیاز به روشی با بازده بالا، کم هزینه، بدون تولید مواد سمی و بدون آسیب‌های زیست محیطی رو به افزایش می‌باشد. یکی از روش‌های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای تولید نانوذرات رو به افزایش می‌باشد. منابع متعددی مانند گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها در تولید زیستی نانوذرات کاربرد دارند (۱۶). به طور کلی مزیت تولید گیاهی نانوذرات بر سایر روش‌های زیستی، بی خطر بودن و همچنین قابلیت‌های بالای گیاهان دارویی است که بسیار قابل اعتماد و سالم تر از باکتری، قارچ و مخمر برای تولید نانوذرات است (۱۷).

روت و همکاران با استفاده از گیاه *C. asiatica*، اقدام به سنتز سبز نانوذرات نقره نمودند. در این تحقیق از نیترات نقره به عنوان پیش‌ساز فلزی استفاده

شد که تغییر رنگ از زرد ملایم به تیره نشان دهنده سنتز نانوذرات نقره بود که این تغییر رنگ با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. متوسط اندازه ذرات تولید شده ۱۰۰ نانومتر تعیین گردید و دارای اشکال کروی و مکعبی بود (۱۸). با توجه به تصویر SEM در مطالعه حاضر، نانوذرات دارای اندازه ۱۹ نانومتر می‌باشند که سایزی کوچکتر از تحقیق روت و همکاران می‌باشد.

لاگسواری و همکاران با استفاده از پودر گیاه *C. asiatica* و در دمای اتاق موفق به سنتز نانوذرات نقره شدند. این نانوذرات دارای اندازه متوسط ۴۲ نانومتر بودند. نانوذرات تولید شده خواص آنتی باکتریال مؤثری در برابر عوامل بیماری‌زا از خود نشان دادند (۱۹). نانو ذره سنتز شده در تحقیق حاضر نزدیک به تحقیق لوگسواری و همکاران هست، ولی اندازه کوچکتری در تحقیق حاضر حاصل شده است.

در هر دو تحقیق فوق از عصاره آبی برگ گیاه استفاده شد که اندازه ای بزرگتر از نانو ذرات زیستی سنتز شده در تحقیق حاضر دارند.

شفقت و همکاران با استفاده از گیاه *Viburnum lantana* نانوذرات نقره را سنتز و اثر آنتی باکتریال و ضد قارچی آن را بررسی کردند. در این تحقیق با استفاده از عصاره متانولی گیاه، نانوذراتی در محدوده ۲۰-۸۰ نانومتر و با اندازه متوسط ۴۸ نانومتر سنتز شد. در این بررسی‌ها مشخص شده است که فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره با ساختار مکعب و مکعب مستطیل، نسبت به شکل

باشد سبب ۶۰ درصد مهار رشد می‌شود، ولی عصاره و نانو ذره به تنهایی ۴۸/۳۳ درصد سبب مهار شدند. این در حالی است که اثر سایتوتوکسیک بر رده سلول نرمال ۹۲۹- L تا ۴۲۱/۱۰ درصد کاهش داشت (۲۲). در مطالعه حاضر نانوذره نقره این گیاه مورد استفاده قرار گرفت و نتایج نشان داد که ۸/۷۶ میکروگرم از این نانو ذره ۵۰ درصد مهار رشد نشان می‌دهد، این در حالی است که IC50 برای سلول‌های نرمال HEK-۲۹۳، ۱۸/۴۷ میکروگرم بود.

یالینگ و همکاران اثر آسیاتیک اسید یکی از ترکیب‌های فعال این گیاه را بر دو رده سلول سرطان پستان MCF-۷ و MDA-MB-۲۳۱ بررسی کردند که IC50 برای رده MCF-۷، ۵/۹۵ میکرومول محاسبه شد و برای MDA-MB-۲۳۱، ۱۲ میکرومول محاسبه شد که نشان دهنده اثرسمی کمتر این گیاه بر سلول نرمال است و در مطالعه حاضر نیز به اثبات رسید (۲۳).

در مطالعه‌های انجام شده اثر سمیت عصاره گیاه آب بشقابی بر سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده است، در مطالعه حاضر نیز این گیاه اثر سمیت بالایی را از خود نشان داد با این تفاوت که از نانوذرات سنتز شده حاصل از این گیاه استفاده شد که در مقایسه با اثرات عصاره به تنهایی عمل کرد بهتری مشاهده شد.

سایز نانو ذرات سنتز شده در مطالعه‌های مختلف بسیار وابسته به نوع روش به کار رفته و جنس و گونه گیاه دارد. با مقایسه اندازه نانو نقره زیستی سنتز شده با میانگین حدود ۱۹ نانومتر در

کروی، دارای تأثیرات بیشتری روی میکروارگانیسم‌ها و سلول‌ها است (۲۰).

ردی و همکاران نانوذرات نقره با استفاده از گیاه *Piper longum* را سنتز نمودند. در این تحقیق خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نانوذرات تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات دارای اشکال کروی و با میانگین ۴۶ نانومتر اعلام شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده پتانسیل بیشتری علیه باکتری‌های پاتوژنیک نسبت به عصاره گیاه داشتند. این ذرات هم‌چنین دارای خاصیت سایتوتوکسیک علیه رده سلولی MCF-7 سرطان سینه بودند. مقدار IC50 محاسبه شده برای این نانوذرات بر اساس تست MTT معادل ۶۷ میکروگرم بر میلی لیتر طی ۲۴ ساعت محاسبه گردید (۲۱). در حالی که در مطالعه انجام شده میانگین اندازه ذرات ۳۰ نانومتر و مقدار IC50 نانوذره نقره در زمان ۲۴ ساعت مقدار ۸/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید که نشان دهنده سنتز مؤثرتر و اثر کشندگی قوی‌تر نانوذره تحقیق حاضر می‌باشد.

سواتی جی اس و همکاران پتانسیل درمانی نانو ذره اکسید آهن تولید شده و عصاره متانولی *C. asiatica* بر رده ی سلولی MCF-7 مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق ابتدا عصاره متانولی از گیاه تهیه شد سپس نانو ذره اکسید آهن تولید شده و از polyvinylpyrrolidone (PVP) برای انتقال دارو استفاده شد. نتایج نشان داد، ۱۰ میکرولیتر عصاره که بر pvp پوشیده شده با نانو ذره اکسید آهن بارگذاری شده

نانوذرات زیستی حاصل از این پژوهش قادرند جلوی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7 را بگیرند. اثر سایتوتوکسیک بیشتری در رده سلولی MCF-7 در مقایسه با سلول‌های نرمال HEK-293 در نتیجه اثر نانوقره زیستی سنتز شده مشاهده شد، لذا می‌توان امید داشت با انجام تست‌های تکمیلی و مطالعه‌های درون تنی از آن‌ها در درمان سرطان استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین وسیله از زحمات دکتر بازرگان در پیشبرد پروژه قدردانی می‌شود.

تحقیق حاضر در مقایسه با مطالعه‌های دیگر، به نظر می‌رسد که روش به کار رفته و نوع گیاه مورد استفاده در این تحقیق از کارایی بالایی جهت سنتز برخوردار است. به طوری که اندازه نانوذرات سنتز شده در این تحقیق نسبت به سایر تحقیق‌ها کوچکتر بوده و خاصیت سمیت و کشندگی بیشتری نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که نانو ذرات نقره سنتز شده کاملاً وابسته به غلظت و زمان دارای آثار مهاری و ضد تکثیری سلول‌های سرطانی می‌باشند. به طوری که، اثر کشندگی بر روی رده سلولی MCF-7 وابسته به غلظت نانو ذرات نقره است و بدین ترتیب مقدار IC50 طی ۲۴ ساعت برای نانوذرات زیستی و برای رده سلولی سرطانی و نرمال به ترتیب ۸/۷۶ و ۱۸/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

بررسی القا آپوپتوز هم نشان داد که نانو نقره زیستی مذکور، با القا آپوپتوز سبب ایجاد کشندگی و مرگ سلولی در رده سلولی MCF-7 گردید. زیرا بر اساس نتایج حاصل از فلوسایتومتری، القا آپوپتوز بیشتر از بروز نکروز سلولی بود که این افزایش نیز از نظر آماری معنی دار بود. تا به حال گزارشی مبنی بر بررسی القا آپوپتوز با به کارگیری نانو ذره سنتز شده از گیاه *C. asiatica* و با استفاده از کیت انکسین گزارشی نشده است تا بتوان مورد مقایسه قرار داد. مطالعات موجود فقط به سنتز نانو ذره و نهایتاً بررسی اثرات ضد میکروبی آن پرداخته‌اند.

نتیجه‌گیری

REFERENCES

1. Akbari A, Razzaghi Z, Homae F, Khayamzadeh M, Movahedi M, Akbari ME. Parity and breastfeeding are preventive measures against breast cancer in Iranian women. *Breast Cancer* 2011; 18(1):51-5.
2. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 2006; 25(43): 5898-905.
3. Zeichner SB, Ambros T, Zaravinos J, Montero AJ, Mahtani RL, Ahn ER, et al. Defining the survival benchmark for breast cancer patients with systemic relapse. *Breast Cancer (Auckl)* 2015; 9: 9–17.
4. Martirosyan A, Bazes A, Schneider YJ. In vitro toxicity assessment of silver nanoparticles in the presence of phenolic compounds – preventive agents against the harmful effect. *Nanotoxicology* 2014; 8(5): 573-82.
5. Angeles Villanueva, Magdalena Cañete, Alejandro G Roca, Macarena Calero, Sabino Veintemillas-Verdaguer et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* 2009;20: 103-15.
6. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In Vitro Toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to hepg2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 2009;43(5): 6046–51.
7. Rashmezzad MA, Ali Asgary E, Tafvizi F, Shandiz SA, Mirzaie A. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *Tehran University Medical Journal* 2015; 72(12): 799-807.
8. Lindhorst TK. *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry* 3rd ed. Completely Revised and Enlarged Edition: Germany; 2007; ISBN 3-527-31528-4.
9. Mata YN, Torres E, Blazquez ML, Ballester A, Gonzalez F, Munoz JA. Gold (III) Biosorption and Bioreduction with the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 166: 612-8.
10. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009; 32(1): 79-84.
11. Schultz V, Hansel R, Tyler V. *Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine*. 4th ed. Springer: Germany; 2000; 337-8.
12. Gruenwald J, Brendler and Jaenicke C, editors. *PDR for Herbal medicine*. Second edition. Montvale (New Jersey): Medical economics Co; 2000.pp:729-31.
13. Sastravaha G, Yotnuengnit P, BoonCong P, Sangherapitikul P. Adjunctive periodontal treatment with centella asiatica and punica granatum extracts. A preliminary study. *J Int Acad Periodontal*. 2003; 5:106-15.
14. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Chaudhry Q. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today* 2010; 5:165-8.
15. Veerasamy R, Xin TZ, Gunasagaran S, Xiang TFW, Yang EFC, Jeyakumar N, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *J Saudi Chem Soc* 2011; 15: 113-20.
16. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2010; 6(2): 257-62.
17. Karimi Andeani J, Kazemi H, Mohsenzadeh S, Safavi A. Biosynthesis of gold nanoparticles using dried flowers extract of *Achillea Wilhemsii* plant. *Dig J Nanomater Bios* 2011; 6(3): 1011-6.
18. Rout A, Kumar Jena P, Kumar parida U, Kumar Bindhani B. Green synthesis of silver nanoparticles using leaves extract of centella asiatica for studies against human pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Scinces* 2013; 4(4): 661-74.
19. Swathy JS, Praseetha PK, Sakthivel G. Targeted therapy for breast cancer cells by herbal drug formulations of iron oxid nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2016; 9(1): 347-53.
20. Logeswari P, Silambarasan S, Abraham J. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica* 2013; 20(3): 1049–54.

21. Arde SM, Salokhe PR, Mane AH, Salunkhe RS. Facile green synthesis of silver nanoparticles by artemisia pallens leaves extract and evaluation of antimicrobial activity. *Chemical Science Review and Letters* 2014; 3(11): 557-62.
22. Reddy NJ, Nagoor Vali D, Rani M, Rani SS. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. *Materials Science and Engineering* 2014; 1(34): 115-22.
23. Ya-Ling Hsu, Po-Lin Kuo, Liang-Tzung Lin and Chun-Ching Lin. asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* April 2005; 313(1): 333-44.

Antiproliferation Effect of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Centella Asiatica* on Breast Cancer Cell Line

Edalat fard SH¹, Tafvizi F^{1*}, Bikhof Torbati M³

¹Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran, ²Department of Biology, College of science, Yadegar - e- Imam Khomeini (RAH) shahre-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 30 Dec 2016

Accepted: 28 Oct 2017

Abstract:

Background and aim: The use of plants to synthesize nanoparticles is one of the most environmentally friendly methods. The purpose of this study was to synthesize green silver nanoparticles using *Centella asiatica* extract and study the effects of cytotoxicity in breast cancer cell line.

Methods: In this experimental study, the morphology of silver nanoparticles was evaluated using transient electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). MTT was used to evaluate the anti-proliferative effects of biological nanoparticles in breast cancer cell line (MCF-7) and normal cells (HEK-293). Apoptotic assays were performed using flow cytometry with Annexin V kits. Data were analyzed using two-way ANOVA statistical tests.

Results: Spherical particles were synthesized with an average of 19.19 nm. Antimicrobial activity in MCF-7 cells increased with increasing concentrations and time of nanoparticles. IC₅₀ of silver nanoparticle was 24.88 µg / ml in cancerous cells. Increasing apoptosis was observed in cells treated with biological nanoparticles at IC₅₀ concentration compared to control cells (p <0.001). Also induction of apoptosis in MCF-7 cells was more than necrotizing compared to control (p<0.001).

Conclusion: The synthesized silver nanoparticles have the effect of cellular toxicity and induction of apoptosis on cancer cells in a concentration-time pattern.

Keywords: Botanical Plants, Biodegradable Nanoparticles, Cytotoxicity

Corresponding author: Tafvizi F, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
Email: farzanehtafvizi54@gmail.com

Please cite this article as follows:

Edalat fard SH, Tafvizi F, Bikhof Torbati M. Antiproliferation Effect of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Centella Asiatica* on Breast Cancer Cell Line. *Armaghane-danesh* 2017; 22 (5): 570-583.